This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C12N 15/53, 15/54, 15/82, 9/10, 9/04, C12Q 1/02, A01H 5/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

17. Februar 2000 (17.02.00)

WO 00/08169

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/05467

(22) Internationales Anmeldedatum:

30. Juli 1999 (30.07.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 35 219.0 198 45 216.0	5. August 1998 (05.08.98) 1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE
198 45 231.4	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE
198 45 224.1	1. Oktober 1998 (01.10.98)	DE

Veröffentlicht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SUN-GENE GMBH & CO.KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06468 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REINDL, Andreas [DE/DE]; Albertine-Scherer-Strasse 21, D-67134 Birkenheide (DE). MEJIA, Patricia Leon [MX/MX]; Ganzalo de Sandoval 226, Cuernavaca, Morelos 62250 (MX). PALMAS, Juan Manuel Esteves [MX/MX]; Entrada a Ojo de Agua Col., Loma Bonita Tecamac Estado (MX). GRACIA, Maria Araceli Canter [MX/MX]; 2da Privad Los Pinos 22, Loma Bonita Cuernavaca, Morelos 62210 (MX). EBNETH, Marcus [DE/DE]; Bicklingerweg 16, D-06486 Quedlinburg (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).

Mit internationalem Recherchenbericht, Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES.

(74) Anwalt: LANGFINGER, Klaus-Dieter, BASF Aktienge-

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, ZA,

FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

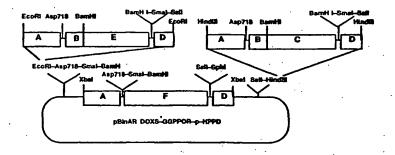
sellschaft, D-67056 Ludwigshafen (DE).

(54) Title: DNA SEQUENCE CODING FOR A 1-DEOXY.-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE SYNTHASE AND THE OVERPRODUC-TION THEREOF IN PLANTS

(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ KODIEREND FÜR EINE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHAT SYNTHASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN

> Binarer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli, des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana und des HPPD-Gens aus Streptomyces avermitilis in den Plastiden transgener Pflanzen.

BINARY VECTOR FOR OVEREXPRESSING THE DOXS-GENE FROM E. COLL THE GGPPOR GENE FROM ARABIDOPSIS THALIANA AND THE HPPD GENE FROM STREPTOMYCES AVERMITILIS IN THE PLASTIDS OF TRANSGENIC PLANTS



(57) Abstract

Method for the production of plants with enhanced vitamin E biosynthesis efficiency by overproduction of a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene from Arabidopsis or E. coli.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis bzw. E. coli.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL Albanien BS Spanien LS Lesotho AM Armenien FI Finnhand LT Litamen AT Österreich FR Frankreich LU Luxemburg AU Australien GA Gabun LV Leuland AZ Aserbaidscham GB Vereinigtes Königreich MC Monaco RA Bonnien-Herzepowina GE Georgien MD Republik Moldam	SI SK SN SZ TD TG	Slowakei Senegal Swasiland Tachad Togo
AM Armenica FR Frankreich LU Luxemburg AU Australien GA Gabun LV Leuland AZ Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco	SN SZ TD TG	Senegal Swasiland Tachad
AU Australien GA Gabum LV Leuland AZ Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco	SZ TD TG	Swasiland Tachad
AZ Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco	TD TG	Tachad
AZ ASCIDENSCIED OF THE MALE AND	TG	
DA Bouries Verseauries : GR Georgies MD Republik Moldan		
DA DUSTICIZEROWINE OF COMPANY		
BB Barbados GH Ghana MG Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE Belgien GN Guinea MK Die ehemalige jugoslawisch		Turkmenistan
BF Burkina Pago GR Griechenland Republik Mazedonien	TR	Torkei
BG Bulgarien HU Ungarn ML Mali	TT	Trinklad und Tobago
BJ Benin IE Irland MN Mongolei	UA.	Ukraine
BR Brasilies 1L Israel MR Mauretanien	UG.	Uganda
BY Belants IS Island MW Malawi	us	Vereinigte Staaten von
CA Kanada IT kalien MX Mexiko	* .	Amerika
CF Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Niger	UZ	Usbekistan
CP Zenraminanische Republik	VN	Victnam
CG Kongo	YU	Jugoslawien -
Ch Schweiz	zw	Zimbabwe
Ci Cate a lyone		
LIVE REINGIUM		
CR China		
CU Rucii		
CZ Ischechische Republik		
DE Dentschland LI Liechtenstein SD Sudan		
DK Dinemark LK Sri Lanka SE Schweden		
RE Estland LR Liberia SG Singapur		

DNA-Sequenz kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-,

- 10 Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequen-
- 15 zen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-
- 20 Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, die
- 25 Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyro-
- 30 phosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden, Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No.
- 35 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, die derart hergestellten Pflanzen selbst, sowie die Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems

40 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch

45 auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) 5 stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a- d):

10

15

1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$

1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$

1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

20

25

2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$

30 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = CH_3$, $R^2 = H$

2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$

2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α-Tocopherol.

35

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können

- 40 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch
- 45 wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Tocopherol Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthesegen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren 5 setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen
10 lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus
C5-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B.
Carotinoide) bestehen aus C-Skeletten, die ausschließlich auf
Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide
(z.B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit
15 einem aromatischen Kern verbunden ist.

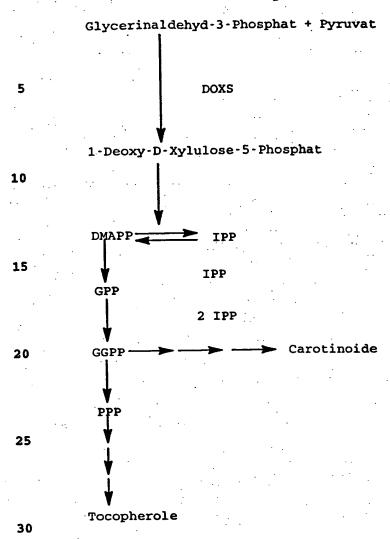
Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über ß-Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C₅), dem Isopentenylpy-20 rophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit C¹³ gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:

25

30

35

40



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten

- 35 "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1),129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3),
- 40 271-274 (1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich
- 45 zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflußt ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59(1983), 50-60. Der Mevalonat-

unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al, 1997).

- 5 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C10) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C15) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen
- 10 (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

- Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxy-
- 20 phenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α-Tocopherol und α-Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst
- 25 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).
- In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Mani30 pulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflußen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen
- 35 werden (Fray und Grierson, Plant Mol.Biol.22(4),589-602(1993);
 Fray et al., Plant J., 8, 693-701(1995). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenyl-
- 40 alanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624(1996).
- Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Toco-45 pherol-Gehaltes in Pflanzen durch Übeexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch

verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer 5 transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Sythase (DOXS)-10 Gens in den Pflanzen.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide

15 erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS
durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Orgnismus der
selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines
heterologen Gens (Gens aus entfernten Organismen) erreicht
werden. Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana DOXS

20 (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze
(Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel 1 wird das DOXS-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No.:1; Mandel et al, Plant J. 9, 649-658(1996);

- 25 Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltenen Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen kodiert, das mit SEQ-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen 30 Organismen wie zum Beispiel E. coli (SEQ-ID No. 3) bzw. vorzugs-
 - O Organismen wie zum Beispiel E. coli (SEQ-ID No. 3) Bzw. Volzugs weise aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

- Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsammler-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag
- 40 Heidelberg Berlin Oxford, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurückführen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, Trends in Plant Sciences 1; 21-26(1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylu-
- 45 lose-5-Phosphat Synthase defekte Arabidopsis thaliana Mutante isoliert, die einen "Albino-Phānotyp" zeigt (Mandel et al, 1996).

Daraus ist abzuleiten, daß eine verringerte Menge an Carotinoiden in den Plastiden negative Auswirkungen auf die Pflanze hat.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 5 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isopre10 noid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen
die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli
erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer hetero15 loger Gene erreicht werden.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

20

Darüberhinaus verstärkt die Bildung von Homogentisinsäure den Metabolitfluß weiter in Richtung von Phytylquinonen und damit Tocopherol, siehe Abbildung 1. Homogentisinsäure wird gebildet aus p-Hydroxyphenylpyruvat durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat 25 Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden

25 Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 11 wurde erstmals das HPPD-Gen aus Strep-30 tomyces avermitilis (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 5) zusammen mit der DOXS aus E.coli SEQ-ID No. 3 in Pflanzen und pflanzlichen Plastiden überexprimiert.

Die Erhöhung der plastidären IPP Bildung führt zur verstärkten
35 Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung
von Homogentisinsäure gewährleistet, daß genügend Substrat für
die Bildung von Tocopherolen in den Plastiden zur Verfügung
steht. Dieses nun vermehrt zur Verfügung stehende Homogentisat
kann in den transgenen Pflanzen seinerseits mit der durch die
40 Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP)

- 40 Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP) umgesetzt werden. PPP nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da es einerseits als Ausgangssubstrat für Chlorophylle und Phylloquinone, andererseits für Tocopherole dient.
- 45 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-und das HPPD-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von

Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

- Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der DNA-Sequen-5 zen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5, die für eine DOXS bzw. HPPD oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Inser-
- 10 tion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. HPPD kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.
- 15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am
- 20 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. HPPD-Gen operativ verknüpft sind.
- 25 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-bzw. HPPD DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylie-
- 30 rungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene
- 35 Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 40 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des
- 45 DOXS- bzw. HPPD-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. HPPD-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK)

oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

- 5 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen und ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der
- 15 Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyllund Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze

- 20 erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz
 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen
 hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe,
 Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt
 sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen,
 20 Pagger Mais Unfan Gein Point Paggerolle Zuckerrübe Ganola
- 30 Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

35

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen
 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vita-

min K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer HPPD DNA-Sequenz in Pflanzen.

Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 5 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isopre10 noid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als
allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide
erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus
E.coli erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer
15 heterologer Gene erreicht werden.

Um das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch 30 geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus 35 Arabidopsis thaliana beschrieben.

Die Erhöhung der plastidären 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und Phytylpyrophosphat Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide, so daß genügend Substrat für die Bildung 40 von Tocopherolen, Chlorophyllen, Vitamin K und Phylloquinonen in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-und das GGPPOR-Gen ent-45 haltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

- Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen

 5 SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 die für eine DOXS
 bzw. GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur
 Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-,
 Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Inser-
- 10 tion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.
- 15 Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am
- 20 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Termi-
- 25 nator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzel-
- 30 lulāren Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 40 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- 45 außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvisrus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des 10 eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS15 bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer
20 (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

- 25 Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor
 - Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw.

aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

- 35 GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch
- 40 und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecu-
- 45 lar Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die

- 5 Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transit-
- 10 peptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen bzw. ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor,

15 beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 20 oder SEQ ID No. 3, SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

25

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Ge-30 genstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen 35 hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Al-40 falfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn zeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequen-

zen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer GGPPOR DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 10 Die Aufgabe wurden auch gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens, eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens und eines Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

15 .

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen

- 20 die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann auch durch Expression homologer oder anderer heterologer DOXS-Gene wie zum Beispiel einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 erreicht werden.
- 25 Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Geranylgeranylpyrophosphat umgesetzt.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Toco30 pherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren
erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens
gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von
35 Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-

Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 7) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert.

40 Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 7 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 15 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana beschrieben.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende PPP in Richtung Toco5 pherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren
erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens
gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von
10 Homogentisinsäure durch verstärkte Umsetzung von Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisinsäure erreicht.

cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen 15 und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 10 wird die Klonierung des HPPD-Gens aus Streptomyces avermitilis beschrieben (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 5). Um eine Plastidenloka-20 lisation zu gewährleisten ist der HPPD aus Streptomyces eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein HPPD-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus Pflanzen stammt.

Die Erhöhung der plastidären D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat, der Phytylpyrophosphat und der Homogentisinsäure Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung dieser Vorstufen gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophylle, Vitamin K und Phylloquinone in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-, das HPPD
35 Gen und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt (Beispiel 17). Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen

40

SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7,
die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder CarotinoidGehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder

45

CDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette
geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die

für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nuklein5 säuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in
der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform
umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende
der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am
3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere

- 10 regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-, das HPPD- bzw. das GGPPOR-Gen
 operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender
 Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente der-
- 15 art, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Va-
- 20 kuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

25

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 30 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- 35 außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen

- 40 steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche
- 45 Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des

eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren

5 Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-,
HPPD-, bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der
PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993),
361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor

10 (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

15

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische

20 Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion
25 eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-, HPPD- bzw.
GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und
DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein
chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und

- 30 Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
- 35 Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-40 Sequenz für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom

45 DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

- 5 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen, ein HPPD-Gen und ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der
- 15 Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyllund Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze er-

20 folgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz
SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7
oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene
Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Ger-

30 ste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nu8- und Weinspezies.

35 Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, eine DNA-Sequenz
- SEQ-ID No. 5 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 45 Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Toco-

pherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.

5 Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines DOXS-Gens
10 aus Arabidopsis oder E. coli bzw. damit hybridisierende DNA-Sequenzen und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der DOXS-Enzymaktivität.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transforma15 tion der Pflanzen mit einem das DOXS-Gen enthaltenden Konstrukt.
Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin
K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Arabidopsis und Raps
eingesetzt.

20 Die Klonierung des vollständigen DOXS-Gens aus Arabidopsis erfolgt über die Isolierung der für das DOXS-Gen spezifischen cDNA (SEQ-ID No. 1).

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ

25 ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 die für eine DOXS oder deren funktionelles Äquivalent kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette 30 geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nuklein35 säuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in
der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform
umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende
der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am
3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere

- 40 regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-Gen operativ verknüpft sind. Unter
 einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen
- 45 Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen

sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaic-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb.

- 10 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):
 - HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- 15 OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.
- 20 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor
- 25 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),
- 30 2195 2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert wer-

- 35 den kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklininduzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein
- 40 durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.
- Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die 45 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische

Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

- 5 Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995),
 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise
 10 einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den PhaseolinPromotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al. Mol. Gen.
 Genet. (1991) 225 (3), 459 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und
 Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen
 und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau einer derar15 tigen Kassette ist in der Abbildung 2 schematisch beispielhaft
 dargestellt.
- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-DNA Sequenz 20 und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: 25 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing 30 Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen 35 entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders forderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant 40 Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des 45 Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxido-5 reduktase) abgeleitet ist.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen 10 enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt 15 werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Praparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster 20 ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regio25 nen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker,
der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker
1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori30 schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger
als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ
bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze
sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen
35 codiert und eine Region für die transkriptionale Termination.
Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnit40 tstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten 45 Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffül-

And the second of the second o

len von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das 5 Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und

10 tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-

- 15 Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.
- 20 Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien

- 30 können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von
- 35 Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke
- 40 können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS 45 kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise

Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

5

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a.

10 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung
15 einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID
No. 1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und
SEQ-ID No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7
bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID
No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende DNA-Se20 quenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder
Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung
des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes
der Pflanze.

25 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

35

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

- 40 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion
- 45 und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genanten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering

and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor 5 kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können 10 ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem 15 verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz 20 noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

25

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines

- 30 Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere
- 35 Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren 40 Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise 45 der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber-

setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die

- 5 Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.
- 10 Als weitere geeignete āquivalente Nukleinsāure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid oder ein funktionell āquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzyma.
- 15 tischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.
- Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.
- 25 Erhöhung des Tocopherol., Vitamin K., Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXSGens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch
- 30 modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens

- 35 sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze beispielsweise in fetthaltigen Samen gewebespezifisch erfolgen kann.
- 40 Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.
- Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-45 Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-

The second of the second

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen,

5 transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die
Sequenz SEQ-ID No.1 oder SEQ-ID No. 3; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID
No. 3 und SEQ-No. 5; SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID
No. 7 bzw. eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und
SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7, oder mit diesen hybridisierende

10 DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

20 Um effiziente Hemmstoffe der DOXS finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der DOXS aus Arabidopsis in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen)
25 kloniert und in E. coli überexprimiert.

Das mit Hilfe der Expressionskassette exprimierte DOXS-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die DOXS spezifischen Hemmstoffen.

30

Dazu kann die DOXS beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der DOXS in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und 35 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung der DOXS sind beschrieben (Putra et. al., Tetrahedron Letters 39 (1998), 23-26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857-12862).

- 40 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf hemmende Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substan-
- 45 zen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind eben-5 falls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

15 .

- Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA Sequenz.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorphyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.

30

- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

35

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

40

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von
Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen
45 von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht
von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-I Blue)

5 wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation
verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1
mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et
al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ
können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere

10 geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die
Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119)
pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984),
8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem 20 Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Beispiel 1

25

Herstellung der Arabidopsis thaliana DOXS-Transformationskonstrukte

Das Arabisopsis thaliana DOXS Gen wurde wie in Mandel et al.
30 (1996) beschrieben als vollständige cDNA in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene) kloniert.

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurde ein 2.3 kb Fragment (mit F-23-C bezeichnet) über die pBluescript KS- Hincll 35 (blunt-end) und Sacl Schnittstellen isoliert. Diese Sequenz enthält die vollständige DOXS-cDNA inklusive Chloroplastentransitpeptid vom ATG-Startcodons bis zu einer EcoRl-Schnittstelle, die 80 bp stromabwärts des Stopcodons liegt. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen Smal (blunt-end) und Sacl in den pBIN 19 3X35S Vektor (Abbildung 3) kloniert (Bevan et al., 1980), der den 35S Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (Franck et al., Cell 21(1), 285-294 (1980)) dreimal hintereinander angeordnet enthält.

Zur Herstellung von Antisense-Konstrukten wurde ein Bereich des 3'-Endes der cDNA (mit F-23-C Antisense bezeichnet) in den oben erwähnten pBIN19-3X35S-Vektor kloniert. Ein Teil des 5'-Bereichs der DOXS-cDNA in pBluescript KS- wurde über Hincll und die DOXS-

interne BglII Schnittstelle verdaut und das entstandene Fragment entfernt. (Abbildung 4). Die BglII-Schnittstelle wurde über die Klenow-fill-in Reaktion (Klenow-Polymerase; Roche; nach Reaktion nach Herstellerprotokoll) aufgefüllt, so daß ein "blunt-end" entstelle. Die nun kompatiblen Enden (BglII-"blunt-end" und HinclII wurden ligiert. Nun wurde der 3'-Bereich der DOXS-cDNA über KpnI und Xbal (beide Schnittstellen liegen im Polylinker von pBluescript KS-5'- und 3'- der DOXS-cDNA) in Antisense-Orientierung in den oben beschriebenen pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung 10 kloniert.

Die Transformationen von Arabidopsis thaliana Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit Agrobakterium tumefaciens mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science 15 265 (1994), 1856-1860). Mehrere unabhängige Transformanden wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transfomierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo-oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt, um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1. Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

	LINIEN	SEGREGATION
30	A9	75%
	A19	100%
	B11	75%
35	B4	100%
	C2	100%
	D3	75%
	D17	100%
	E9	75%
40	E14	100%
	F9	75%
	F14	100%

31

Beispiel 2

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums Escherichia coli XL1 Blue

5

Eine Kultur von Escherichia coli XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert

- 10 wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-
- 15 Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNAse aufgenommen und bei
- 20 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 μl TE/RNAse aufgenommen.

25

Beispiel 3

Isolierung der DOXS aus E. coli

- 30 Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3'
- 35 (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCATGC-3' bzw. 5'-ATG-GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementaren DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem
- 40 Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;
- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script

5 (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S

10 Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower15 Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192
bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des
Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionster20 mination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der 25 genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C 25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

30

Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde

35 durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3). Dabei wurden zwei nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

40

Beispiel 4

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

45 Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20

(1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abbildung 7).

5 Beispiel 5

Nachweis erhöhter DOXS-Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamtprotein (Abbildung 8) aus 15 Tage alten Keimlingen

10 verschiedener, unabhängiger transgener Pflanzen, welche das DOXSÜberexpressionskonstrukt besitzen, wurde isoliert und mit einem
polyklonalen Anti-DOXS-Antikörper (IgG) in einer Westernanalyse
detektiert (Abbildung 9).

15 Beispiel 6

Messung des Carotinoid- und Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllmengen wurde 20 wie in Lichtenthaler und Wellburn (1983) beschrieben mit 100% Acetonextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen der transgenen Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

25 Tabelle 2: Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllgehalt der transgenen DOXS-Linien

30	LINIE	% GESAMT CHLORO- PHYLLE	% GESAMT CAROTINOIDE
ا "	cla1 Mutante	5	5
l	Wild Typ	100	100
ļ	B-4	86	89
.	B-11	84	90
35	C-2	98	107
I	D-3	128	135
	D-17	136	149
	E-14	121	139
40	F-7	80	90
l	F-14	85	107

Beispiel 7

Transformation von Raps

- 5 Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, JB und Damm, B (in Gene, Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien angegeben sind. Die Trans-
- 10 formationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clontech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCR-Terminatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70 %
- 15 (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15
- 20 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zu-
- 25 gabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in LB mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne 30 Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD600 von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD600 von 0.3 eingestellt.

35

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml

- 40 Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und
- 45 zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-

fernt. Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explanten in 90 mm
Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit
Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von
5 16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli
auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt.
Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie
von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G.,eds, Springer Lab Manual, Springer
10 Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

15

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 1) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwednet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transfomierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend

mierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

25

Beispiel 9

Nachweis der Expression der DOXS aus E. coli in transgenen Tabakpflanzen

30

Von Pflanzen, die das Konstrukt pBinAR HPPD-DOXS enthielten, wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 0,9 cm aus völlig entfalteten Blättern genommen und in flüssig Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in einem HEPES-KOH-Puffer, der Pro-

- 35 teinase-Inhibitoren enthielt homogenisiert und aus dem Extrakt mit dem Protein-Assay von Bio-Rad nach Herstellerangaben die Proteinkonzentration bestimmt. 45 µg Protein wurden von jedem Extrakt mit einem Volumen Auftragpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine auf
- 40 einem 12,5 prozentigen SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Danach wurden die Proteine mittels Semi-dry Elektroblots auf Porablotmembran (Machery und Nagel) übertragen. Die Detektion des DOXS-Proteins erfolgte mittels eines Antikörpers gegen die E. coli DOXS aus Kaninchen. Die Farbreaktion basiert auf der Bindung eines sekundä-
- 45 ren Antikörpers und einer alkalischen Phosphatase, die NBT/BCIP zu einem Farbstoff umsetzt. Sekundärer Antikörper und alkalische

Phosphatase stammen von Pierce, die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Abbildung 10 zeigt den Nachweis des DOXS-Proteins in Blättern 5 transgener Pflanzen. 1: Marker; 2: Pflanze 10; 3:62; 4: 63; 5: 69; 7:71; 8:112; 9:113; 10:116; 11:WT1; 12:WT2; 13:100ng rekombinantes Protein; 14:50 ng rekombinantes Protein; 15: 10 ng rekombinantes Protein.

10 Beispiel 10

Klonierung des Gens einer HPPD aus Streptomyces avermitilis

15 Isolierung genomischer DNA des Bakteriums Streptomyces avermitilis U11864:

Eine Kultur von Streptomyces avermitilis U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für

- 20 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HC1, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/
- 25 Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die
- 30 Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNAse aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volu-
- 35 men 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNAse aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus Streptomyces avermitilis (Denoya et al, 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligo-

- 40 nukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA-CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die
- 45 Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C 25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)

10 gereinigt und nach Herstellerangeben in den Vektor PCR-Script
(Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin),

15 vor dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al.,
1994).

Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor

20 hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus

25 Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 11 und 12 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-30 Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984), 35 835-846) zur Transkriptionstermination.

Beispiel 11

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS 40 und HPPD-DNA-Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 13). Die Gensequenzen der DOXS und der HPPD wurden jeweils als BamHI-Fragmente wie in Beispiel 3 und 10 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungs-

signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Der pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktions
10 schnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-CCGCGCCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stop-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

20

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min 5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min 25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

- 25 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TP-HPPD (Abbildung 12).
- 35 Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors (kursiv geschrieben) anlagert, lautet 5'-ATAAGCTT-CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTTGGACCAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)

gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script

(Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 5). Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic 5 Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,

- 10 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des
- 15 Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAA-CGGA-G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit
- 20 der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 3).

 Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984) übertragen.

Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den
25 entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, der wie oben
beschrieben bereits die Sequenz der HPPD enthielt. Es entstand
das Konstrukt pBinAR-HPPD-DOXS (Abbildung 13), dessen Fragmente
folgende Bedeutung haben:

- 30 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
- 35 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS.

Beispiel 12

40 Herstellung von transgenen Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit

45 Sequenzen der DOXS und der HPPD transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert.

der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, lmg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtylessigsäure 10 (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

15 Beispiel 13

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (Brassica napus)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränder20 ten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants,
Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual,
Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

25

Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium tumefaciens Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS und der HPPD verwendet. In allen hier

- 30 verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H₂O gewaschen, in
- 35 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden
- 40 die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min
- 45 inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der

- 5 Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD600 von 0.3 eingestellt.
- 10 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-
- 15 Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min
- 20 gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petri25 schalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor
verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16
Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden
die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-

30 Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

. 35

Beispiel 14

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

40 Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der HPPD (SEQ-ID No. 5) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α-Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen

Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

Beispiel 15

5

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus Arabidopsis thaliana

Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfalteten Blättern von Arabidopsis thaliana:

10

Voll entfaltete Blätter von Arabidopsis thaliana wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die

- 15 Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt.
- 20 Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.
- 25 Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von A. thaliana:

20 μg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 μl 3M Natriumacetat-lösung und 2 μl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 μl 30 Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 μl RNase freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 μl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 μg RNA aus 35 dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.

Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur.J.Biochem.(1998)251(1-2),413-417); Acces40 sion Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine Sall Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGGCGACGATTACACTC-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das
45 Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGACGTGATGA-

TAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stra-5 tagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min 10 5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min 25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von 15 Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ ID No. 7). Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restriktionsschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält 20 den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984),835-846) zur Transkriptionstermination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresi-25 stenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, sollte das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert werden. Das Konstrukt ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeu-

30

tung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment D enthâlt das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur

35 Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 16

40 Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und GGPPOR Sequenzen

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die GGPPOR sind wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide 45 Gensequenzen enthält (Abbildung 15). Das GGPPOR-Gen mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz wurde (wie in Beispiel 15 beschrieben) als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend

geschnittenen Vektor pBinAR-Hyg kloniert. Das Gen der DOXS wurde als BamHI-Fragment wie in Beispiel 3 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des 5 Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Dieses Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

- 10 Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
- 15 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGA-
- 20 G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend
- 25 geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Res.12(1984), 8711-8721) übertragen.

Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA

- 30 des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-
- 35 GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (Kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH,
- 40 Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR (Abbildung
- 45 15), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

10 Beispiel 17

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS-, GGPPOR- und HPPD-DNA-Sequenzen

- 15 Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS, die GGPPOR und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der alle drei Gensequenzen enthält (Abbildung 16). Das GGPPOR-Gen war mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz versehen (wie in Beispiel 15 beschrieben). Der verwendete pBinAR-Hyg Vek-
- 20 tor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.
- Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine 25 andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das
- 30 Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-CCGCGCCGCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stopp-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase von Promega GmbH, Mannheim nach Herstellerangaben. Als
- 35 Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:
 - 5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min 5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
- 40 25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)
gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von
Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz
45 wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script
wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das

Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR-TPp-HPPD.

- 5 Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das p-HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al. 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und
- 10 den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors anlagert (kursiv geschrieben) lautet 5'-ATAAGCTT-CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert
- 15 lautet 5'-ATAAGCTTGGAC-AATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus diesem PCR-Script-Vektor
- 20 wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.
- Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Trans25 ketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den
 Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligo-
- 30 nukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGA-G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH,
- 35 Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrie-
- 40 ben die Sequenz der HPPD enthielt.

Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-

45 termination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den

Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde

- 5 mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertra-
- 10 gen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenzen der HPPD und der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR-HPPD (Abbildung 16), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:
- 15 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids 20 pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 18

25

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter 30 Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α-Tocopherolgehalt 35 der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α-Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht

Beispiel 19

40

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

transfomierten Pflanze erhöht.

Die cDNA der DOXS (SEQ-ID No. 3), der HPPD (SEQ-ID No. 5) und der GGPPOR (SEQ-ID No. 7) wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen 45 und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen

zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transfomierten Pflanze erhöht.

5

Patentansprüche

- Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyllund/oder Carotinoid-Gehalt.
- Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3
 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz kodierend
 für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur
 Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen,
 Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
- 15 3. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xy-lulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll-und/oder Carotinoid-Gehalt.
- Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3
 Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridiund einer DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylusierende DNA-Sequenzen kodierend für eine p-Hydroxyphenylpyrulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
 - Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xy-lulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
 - 35 6. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
 - Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xy-lulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine Hydro-xyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Her-

PCT/EP99/05467 WO 00/08169

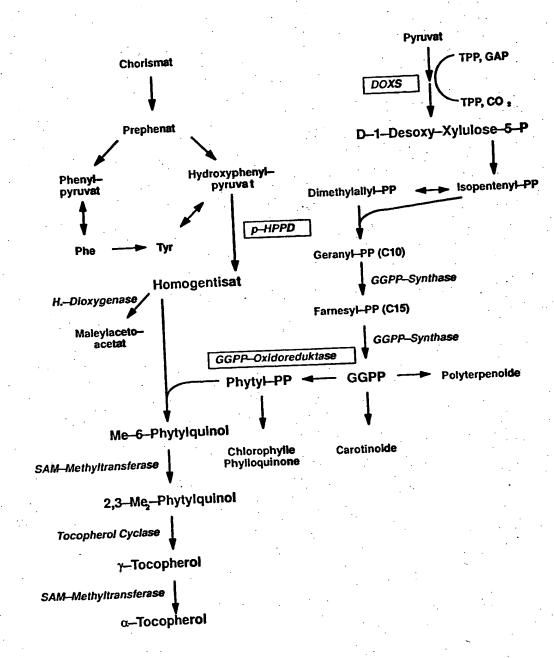
50
stellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-,
Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.

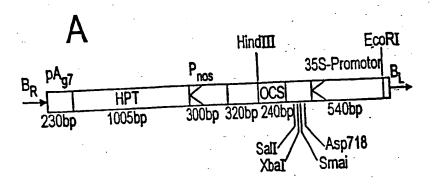
- Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3,
 einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID
 No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend
 für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine
 Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgerahydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (GGPPOR) zur Herstellung von
 nyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von
 Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K,
 Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
- Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhte Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt,
 dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1
 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNASequenz in Pflanzen exprimiert wird.
- 10. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt,
 dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1
 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit
 diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert
 werden.
- 11. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
 - Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
 - 13. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekenn20 zeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen
 21 Promotor und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3
 22 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze
 23 oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
 - 45 14. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und

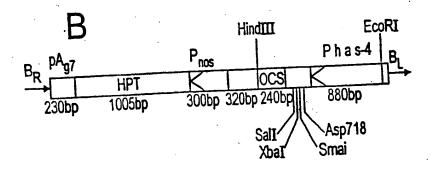
PCT/EP99/05467 WO 00/08169

SEQ-ID No. 5 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.

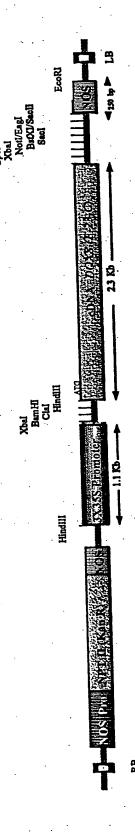
- 15. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
- 10 16. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, SEQ-ID No. 5 und SEQ-ID No. 7 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt. 15 ...
- 17. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 13-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt. 20
 - 18. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 13-16.
- 19. Pflanze nach Anspruch, ausgewählt aus der Gruppe Soja, 25 Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
- 20. Verwendung der SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der 30 DOXS.
- 21. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 13 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS. 35
 - 22. Verwendung einer Pflanze enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung pflanzlicher und bakterieller DOXS.







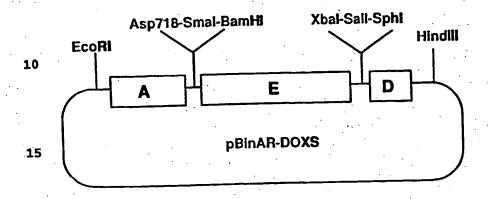
pBin19-3X 35S-F-23-C (Sense)



nRin19-3X 35S-DOXS (Antisense)

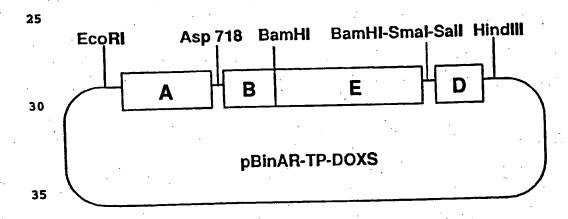
EcoR Kp 2 Handill

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E.coli im 5 Zytosol transgener Pflanzen



20 Abbildung 6

Binarer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli in Plastiden transgener Pflanzen.



40

Abbildung 7: RNA Expressionslevel des DOXS-Gens

B11 C2 K14 E9 D17 D3

Abbildung 8: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

20 30

PCT/EP99/05467

7 / 11

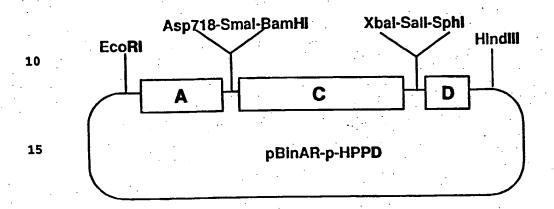
Abbildung 9: Westernanalyse

MW WT A19 B4 C2 D17 E14 F14 F7

75 kD - 75 kD

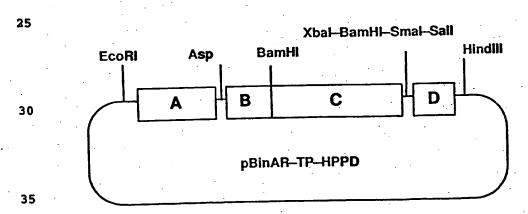
 ∞

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus Streptomyces 5 avermitilis im Zytosol transgener Pflazen



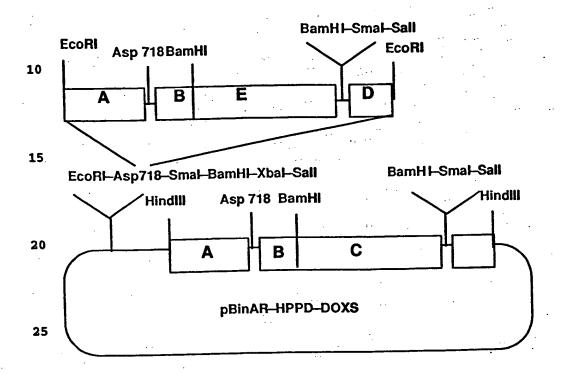
20 Abbildung 12

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus Steptomyces avermitilis im Plastiden transgener Pflanzen



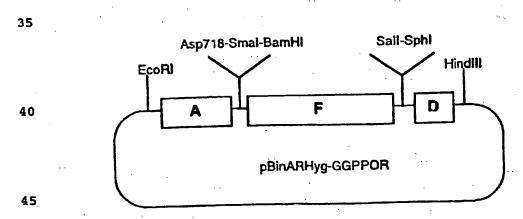
40

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-gens aus Streptomyces avermitilis und des DOXS-Gens aus E.coli in Plastiden transgener 5 Pflanzen.



30 Abbildung 14

Binarer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana in Plastiden transgener Pflanzen.



Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana und des DOXS-Gens aus E. coli in Plastiden transgener 5 Pflanzen.

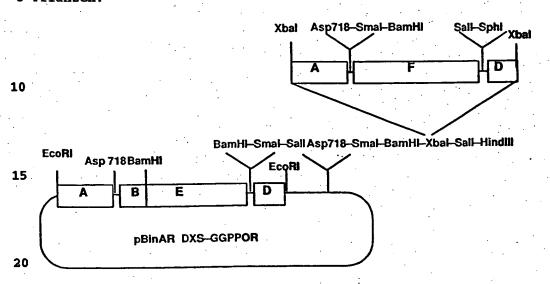
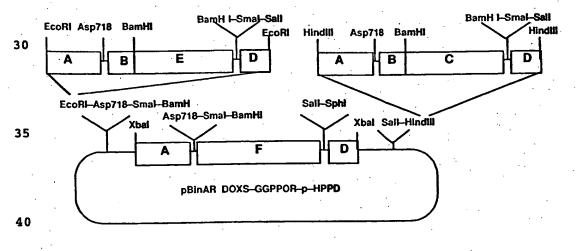


Abbildung 16

25 Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli, des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana und des HPPD-Gens aus Streptomyces avermitilis in den Plastiden transgener Pflanzen.



1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KGaA

<120> DNA-Sequenz kodierend fuer eine
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat Synthase

<130> 0050/49249

<140> 0817 - 00006

<141> 1999-08-04

<160> 8

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2458

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2154)

<400> 1

atg gct tct tct gca ttt gct ttt cct tct tac ata ata acc aaa gga 48
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly
1 5 10 15

gga ctt tca act gat tct tgt aaa tca act tct ttg tct tct tct aga 96
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg
20 25 30

tct ttg gtt aca gat ctt cca tca cca tgt ctg aaa ccc aac aac aat 140
Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn
35 40 45

tcc cat tca aac aga aga gca aaa gtg tgt gct tca ctt gca gag aag 192 Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys 50 55 60

ggt gaa tat tat tca aac aga cca cca act cca tta ctt gac act att

Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile

65 70 75 80

aac tac cca atc cac atg aaa aat ctt tct gtc aag gaa ctg aaa caa 288 Asn Tyr Pro Ile His Met Lys Asn Leu Ser Val Lys Glu Leu Lys Gln

		٠.														
tt	tct	gat	gag	ctg	aga	tca	gac	gtg	atc	ttt	aat	gtg	tcg	aaa	acc	336
eu	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Lys	Thr	
			100					105				•	110	•		•
gt	gga	cat	ttg	ggg	tca	agt	ctt	ggt	gtt	gtg	gag	ctt	act	gtg	gct	384
31y	Gly	His	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	
		115					120					125	•	•	٠.	
									•						,	
ctt	cat	tac	att	ttc	aat	act	cca	caa	gac	aag	att	ctt	tgg	gat	gtt	432
Leu	His	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr	Pro	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	Trp	Asp	Val	
	130	-				135		-			140					•
•					, .									•		
qqt	cat	cag	tct	tat	cct	cat	aag	att	ctt	act	ggg	aga	aga	gga	aag	480
											Gly					-
145					150		-			155		•		-	160	
				•				٠						•		
atq	cct	aca	atσ	agg	caa	acc	aat	ggt	ctc	tct	ggt	ttc	acc	aaa	cga	528
			_								Gly					•
				165				-	170		-			175		
															,	
gga	gag	aqt	. qaa	cat	gat	tgc	ttt	ggt	act	gga	cac	agc	tca	acc	aca	576
		_	_		_						His					
•			180		•	•		185		•			190			
																_
ata	tct	gct	ggt	tta	gga	atg	gcg	gta	gga	agg	, gat	ttg	aag	ggg	aag	624
															Lys	
		195			-	٠	200					205				
											•	-			•	
aac	aac	aat	gt	gtt	gct	gto	att	. ggt	gat	ggt	gcg	atg	acq	gca	gga	672
															Gly	
	210)				215	5				220)				
									٠.		•					
caç	gci	t tai	t gaa	a gc	ato	g aac	c aac	gco	gga :	tat	t cta	gac	tct	gat	atg	720
Glr	Ala	а Ту	r Gl	u Ala	a Met	L Ası	n Ası	n Ala	Gly	Ty:	r Lev	Asp	Sei	r Asp	Met	•
225	, j				23	0	•			235	5				240	
att	gt	g at	t ct	t aa	t ga	c aa	c aa	g caa	gto	tc:	a tta	cct	aca	a gct	act	768
Ile	e Va	1 11	e Le	u As:	n As	p As	n Ly:	s Gli	ı Val	Se	r Lei	ı Pro	Th	r Ala	a Thr	
				24		=			250					255		
								_								
tte	g ga	t ga	a cc	a ag	t cc	a cc	t gt	t gg	t gca	a tt	g ago	agt	gc1	t cti	agt	816
				-											ı Ser	
	•		26					26					27			•
				-												
cg	g tt	a ca	q to	t aa	c cc	a ac	t ct	c aq	a gad	g tt	g aga	a gaa	a gt	c gca	a aag	864
															a Lys	
											_	_			-	

											•					
ggt	atg	aca	aag	caa	ata	ggc	gga	cca	atg	cat	cag	ttg	gcg	gct	aag	912
Gly	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	His	Gln	Leu	Ala	Ala	Lys	
•	290					295					300					
			•													
gta	gat	ata	tat	qct	cga	.gga	atg	ata	agc	ggt	act	qqa	tcg	tca	ctg	960
	Asp			_												
305				-	310	•				315					320	
		•														
ttt	gaa	gaa	ctc	aat	ctt	tac	tat	att	aat.	cca	att.	gat	aaa	cac	aac	1008
	Glu	-			•						_	-				
LIIC	GIG	GIU	Deu	325	DCu	-3-	-3-		330		•	qua	O ₁	335	<i>-</i>	
•				323	-				330			•	•	333		
-4-																1056
	gat	_	_	-	-					-	_	-				1056
ITE	Asp	Asp		Val	ALA	TIE	Leu		GIU	vaı	Lys	ser		Arg	Thr	
	•		340					345					350			
	gga		-						-	•			-			. 1104
Thr	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	His	Val	Val	Thr	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	•
		355	•				360					365				
		•														
cct	tac	gcg	gag	aga	gct	gat	gac	aaa	tac	cat	ggt	gtt	gtg	aaa	ttt	1152
Pro	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Asp	Lys	Tyr	His	Gly	Val	Val	Lys	Phe	
	370	,				375		•			380					
gat	. cca	gca	acg	ggt	aga	cag	ttc	aaa	act	act	aat	gag	act	caa	tct	1200
Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Arg	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr	Asn	Glu	Thr	Gln	Ser	
385	ò		•		390					395		·		•	400	
					-									•		
tac	aca	act	tac	: ttt	. gcg	gag	gca	tta	gto	gca	gaa	gca	gag	gta	gac	1248
Ty	Thi	Thi	туг	: Phe	. Ala	Glu	Ala	Lev	Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Val	Asp	
				405	5				410)				415		
	•													:		
aaa	a gat	gt	g gtt	gcg	att	cat	gca	gcc	atg	gga	ggt	gga	acc	ggg	tta	1296
Ly	s Asp	Va.	l Val	LAla	a Ile	e His	. Ala	a Ala	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu	
	_		420	ס				425	5		-		430	1		
aa	t cto	: tti	t caa	a cat	t ca	: tto	cca	aca	a aga	tat	tto	gat	αta	qqa	ata	1344
	n Lei			-	_					_		-	-			
		43			, :	,	440			, -,-		445				
		70.	•					•				170	•			
ac	יבח ח	9 62	a ca.		a nti	t act	. .	t act	t ace	ı aat	. ++=		tat	gas	ggc	1392
				_	_							_				-472
~1			u Hl:	s Ali	a vd.			- Mi	a. MIC				. Cys	, GIL	Gly	
	45	U				45	,			•	460	· .				
	_					_										3 4 4 6
				-	_						_	_			tat	1440
Le	u Ly	s Pr	o Ph	е Су	s Al	a Il	е Ту	r Se	r Se	r Phe	e Met	Glr	Arg	Ala	Tyr	

463					470	٠				4/5			-		480		
gac	cag	gtt	atc	cat	gat	att	gat	tta	caa	aaa	tta	cca	qta	aga	ttt	1488	
_	_	-	-		Asp	-	-					-		_		٠	
•				485				•	490					495	•		
		-											•		*		
		-	-		gga											1536	
Ala	Met	Asp	Arg 500	Ala	Gly	Leu	Val	505	Ala	Asp	GIÄ	Pro	Thr 510	His	Cys		
	٠		300					303			•		310	•			
gga	gct	ttc	gat	gtg	aca	ttt	atg	gct	tgt	ctt	cct	aac	atg	ata	gtg	1584	
Gly	Ala	Phe	Asp	Val	Thr	Phe	Met	Ala	Cys	Leu	Pro	Asn	Met	Ile	Val	•	
		515					520	•				525					
											•••						
					gaa Glu											1632	
Mec	530		SEL	wsp	Gru	535	Asp	Deu	rne	ווכא	540	Val	a	1111	ALG		
								•				•			•		
gtt	gcg	att	gat	gat	cgt	cct	tct	tgt	ttc	cgt	tac	cct	aga	ggt	aac	1680	
		Ile	Asp	Asp	Arg	Pro	Ser	Cys	Phe		Tyr	Pro	Arg	Gly			
545					550					555	٠				560		
aat	att	σαε	att	gca	. tta	cct	ccc	qqa	aac	aáa	gat	att	cca	att	gaġ	1728	
				-	Leu												
				565	•		-		570					575			
	•															1226	
					att Ile										ttg Lev	1776	
	. 01)	, "Ly.	580	-				585			9	***	590			• *	
													<i>:</i>		٠.		
															ctc	1824	
Gly	ту:	-	_	r Ala	a Val	. Gln			Leu	Gly	Ala			Met	Leu		
	·	59	5			-	600	,				605 ⁻			•		
gaa	a qaa	a. cα	c aa	a tta	a aac	: qta	act	. qta	gcg	gat	qca	cgg	ttt	tgo	aag	1872	
															Lys	•	
	61	0				615	5				620	i. '			•		
								•									
			-	_											gtt Val	1920	
62		u AS	p Ar	g AI	а ње 630		= AL	y sei	. Der	635		SEL	nrs	GI	640		
	-											•					
ct	g at	c ac	g gt	t ga	a ga	a gg	t to	c ati	t gga	ggt	: ttt	ggc	tcg	cac	gtt:	1968	
Le	u Il	e Th	r Va	1 G1	u Gl	u Gl	y Se	r Il	e Gly	, Gl	Phe	Gly	Ser		val		
				64	5				650).				655	5		
αt	t co	a ++	+ ~+	+ ~~	t ct	C 45	t aa	t ct	t cti	tan :	. aar	. 222	ctr	. 22	g tgg	2016	
															Trp		
_		-•								•	. – .			•	•		

665

670

aga cca atg gta ctg cct gat cga tac att gat cac ggt gca cca gct Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala 680 685 675 gat caa cta gct gaa gct gga ctc atg cca tct cac atc gca gca acc Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr 695 gca ctt aac tta atc ggt gca cca agg gaa gct ctg ttt tga 2154 Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe 705 710 715 gagtaagaat ctgttggcta aaacatatgt atacaaacac tctaaatgca acccaaggtt 2214 tettetaagt actgateaga attecegece gagaagteet ttggcaacag etatatatat 2274 ttactaagat tgtgaagaga aaggcaaagg caaaggttgt gcaaagatta gtattataga 2334 taaaactggt atttgttttg taattttagg attgtgatga gatcgtgttg taccaataac 2394 taacatcttg taaaatcaat tactctcttg tgatcttcaa taagcttgag tgacaaaaaa 2454 2458 aaaa

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly 10

Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg 20 25

Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn 35 40 45

Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys 50

Gly Glu Tyr Tyr Ser Asn Arg Pro Pro Thr Pro Leu Leu Asp Thr Ile 65 70 75

Asn	Tyr	Pro	Ile	His 85	Met	Lys	Asn	Leu	Ser 90	Val	Lys	Glu	Leu	Lys 95	Gln
Leu · ·	Ser	Asp	Glu 100	Leu	Arg	Ser	Asp	Val 105	Ile	Phe	Asn	Val	Ser 110	Lys	Thr
Gly	Gly	His 115	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu 120	Gly	Val	Val	Glu	Leu 125	Thr	Val	Ala
Leu	His 130	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr 135		Gln	Asp	Lys	Ile 140	Leu	Trp	Asp	Val
Gly 145		Gln	Ser	Туг	Pro 150	His	Lys	Ile	Leu	Thr 155	_	Arg	Ärg	Gly	Lys 160
Met	Pro	Thr	Met	Arg 165	Gln	Thr	Asn	Gly	Leu 170		Gly	Phe	Thr	Lys 175	Arg
Gly	Glu	Ser	Glu 180		Asp	Cys	Phe	Gly 185	Thr	Gly	His	Ser	Ser 190	Thr	Thr
Ile	: Ser	195	-	Leu	Gly	Met	Ala 200		Gly	Arg	Asp	Leu 205	_	Gly	Lys
Asr	210		val	. Val	. Ala	Val 215		: Gly	Asp	Gly	Ala 220		Thr	Ala	Gly
G1r 225		туі	Glu	ı Ala	230		n Asn	Ala	Gly	7 Tyr 235		Asp	Ser	Asp	Met 240
110	e Va.	1 11	e Lei	1 Ası 24		Ası	a Lys	s Gln	Va)		Leu	Pro	Thr	Ala 255	Thr
Let	u As _i	p Gl	26	_	r Pro) Pro	o Val	265		a Let	ı Ser	Ser	270		Ser
Ar	g Le	u Gl: 27		r As	n Pro	Ala	a Lei 28		g Glu	ı Leı	ı Arç	285		Ala	Lys
Gl	y Me 29		r Ly	s Gl	n Il	e G1 29	-	y Pro	Me1	t Hi	300		ı Ala	Ala	Lys
Va 30		p Va	1 Ту	r Al	a Ar		у Ме	t Ile	e Se	r Gl;		c Gly	y Sei	Sei	320
Ph	e Gl	u Gl	u Le	u G1 32	-	u Ty	т Ту	r Il	e G1 33		o Va	l As _l	e Gl	His 335	s Asn

WO 00/08169 PCT/EP99/0540

Ile	Asp	Asp	Leu 340	Val	Ala	Ile	Leu	Lys 345	Glu	.Val	Lys	Ser	Thr 350	Arg	Thr
Thr	Gly	Pro 355	Val	Leu	Ile	His	Val 360	Val	Thr	Glu	Lys	Gly 365	Arg	Gly	Tyr
Pro	Tyr 370	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp 375	Asp	Lys	Tyr	His	Gly 380	Val	Val	Lys	Phe
Asp 385	Pro	Ala	Thr	Gly	Arg 390	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr 395	Asn	Glu	Thr	Gln	Ser 400
Tyr	Thr	Thr	Tyr	Phe 405	Ala	Glu	Ala	Leu	Val 410	Ala	Glu	Ala	Glu	Val 415	Asp
Lys	Asp	Val	Val 420	Ala	Ile	His	Ala	Ala 425	Met	Gly	Gly	Gly	Thr 430	Gly	Leu
Asn	Leu	Phe 435		Arg	Arg	Phe	Pro 440	Thr	Arg	Cys	Phe	Asp 445	Val	Gly	Ile
Ala	Glu 450		His	Ala	Val	Thr 455	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu 460	Ala	Cys	Glu	Gly
Leu 465		Pro	Phe	Cys	Ala 470	Ile	Tyr	Ser	Ser	Phe 475	Met	Gln	Arg	Ala	Tyr 480
Asp	Gln	Val	Val	His 485	Asp	Val	Asp	Leu	Gln 490	Lys	Leu	Pro	Val	Arg 495	Phe
Ala	Met	Asp	Arg 500		Gly	Leu	Val	Gly 505	Ala	Asp	Gly	Pro	Thr 510	His	Cys
Gly	Ala	Phe 515		Val	. Thr	Phe	Met 520		Cys	Leu	Pro	Asn 525	Met	Ile	Val
Met	Ala 530		Ser	: Asp	Glu	Ala 535		Leu	Phe	Asn	Met 540	Val	Ala	Thr	Ala
Val 545		Ile	e Asp	Asp	Arg 550		Ser	Cys	Phe	Arg 555	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn 560
Gly	Ile	: GL3	/ Val	1 Ala 565	Leu 5	Pro	Pro	Gly	Asn 570		Gly	Val.	Pro	Ile 575	Glu

580

Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu

585

Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
595 600 605

Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys 610 615 620

Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val 625 630 635 640

Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val 645 650 655

Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
660 665 670

Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala 675 680 685

Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr 690 695 700

Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe 705 710 715

<210> 3

<211> 1863

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1863)

<400> 3

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1 10 15

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
20 25 30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg 144
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
35 40 45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

WO 00/08169 PCT/EP99/05467

His		Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	His	
	50	·				55	٠				· 60					
tat	gtc	tac	aac	acc	ccq	ttt	qac	caa	tta	att	taa	gat	ata	aaa	cat	240
					Pro											
65		-] -			70					75		Asp	Val	GIY.	80	
•				,	,,			•		73					80	
					aaa											288
Gln	Ala	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Ile	Gly	
				85					90	•	•			95		
acc	atc	cat	саσ	aaa	ggc	aat	cta	cac	cca	ttc	cca.	taa	cac	aac .	722	336
					Gly											
		9	100	2,5		01 J	202	105	110	ruć	FIO	. ILP	_	Gry	GIU	
			100					103			•		110			
					tta										-	384
Ser	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	
		115					120					125	•	٠		
qcc	gga	att	aat.	att	gcg	att	act	acc	gaa	aaa	gaa	aac	222	aat	cac	432
					Ala										-	102
	130		,			135					140	GLY	БyЗ	A311	Arg	
																-
					att							_		-		480
Arg	Thr	Val	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Ala	
145	-			•	150					155					160	
ttt	gaa	qcq	atq	aat	cac	aca	ggc	gat	atc	cat	cct	σat.	atσ	cta	ata	528
					His							-	_	-		
				165			•	•	170					175		
						٠.										
					gaa							-				576
Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Met	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ala	Leu	
			180					185					190			
aac	aac	cat	cta	gca	cag	ctq	ctt	tcc	ggt	aaσ	ctt	tac	tct	tca	cta	624
					Gln											
		195					200					205				
															٠.	
cgc	gaa	ggc	ggg	aaa	aaa	gtt	ttc	tct	ggc	gtg	ccg	cca	att	aaa	gag	672
Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Glu	
	210)				215	٠				220					
cta	cto	. 222	Cac	200	gaa	us s	cat	att	222	995	a+~	a+-	a+-	cc+	ac	720
					Glu											720
225		. "Dys	Arg	Int	230		กร	116	nys	•	net	val	val	LLO		
					230					235					240	•
acg	tto	ttt	gaa	gaq	ctg	ggc	ttt	aac	tac	atc	ggc	cca	ata	gac	agt	768

	Thr I	Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Phe			Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly	
			•		245					250					255		
	cac q	gat	gtg	ctg	ggg	ctt	atc	acc	acg	cta	aag	aac	atg	cgc	gac	ctg	816
	His A	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Arg	Asp	Leu	
	:			260		٠,	•		265			•		270			
•	aaa d	aac	cca	cag	ttc	cta	cat	atc	atg	acc	aaa	aaa	ggt	cgt	ggt	tat	864
	Lys (_	-		-							-				
		,	275					280			-3-		285			- • -	•
							•			•							
	gaa		~~~	~~~		~ 2 ~		atc	act	ttc	cac	acc	at a	cct	aaa	+++	912
	-	_	-	-		_											
			ATA	GIU	гÀг	Asp		TTE	int	Pne	птэ		vaı	PIO	гуэ	FIIE	
٠		290	•				295					300					
																	0.50
	_			-		tgt	-										960
	Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Cys	Leu	Pro	Lys	Ser			Gly	Leu	Pro		
	305					310					315					320	
						ggc											1008
	Tyr	Ser	Lys	Ile	Phe	: Gly	Asp	Trp	Leu	Cys	Glu	Thr	Ala	Ala	Lys	Asp	*
					325	,				330					335		
	aac	aag	cto	ato	geç	att	act	ccg	gcg	atg	cgt	gaa	ggt	tcc	ggc	atg	1056
	Asn	Lys	Let	ı Met	: Ala	ılle	Thr	Pro	Ala	Met	Arg	Glu	Gly	Ser	Gly	Met	
		•		340)				345					350			
					•												
	gtc	gag	, tti	t tca	a cgt	t aaa	tto	ccg	gat	cgc	tac	tto	gac	gtg	gca	att	1104
					-											Ile	•
			35			-		360		-	_		365			٠	
		•										-			٠.		
	acc	gac	ı ca	a ca	ר מר	a ata	acc	: ttt	. act	aco	aat	cto	aco	att	aat	ggg	1152
					_	_										Gly	
	7.I.u	370			5 AL	a vu.	375		. ,		. 01,	380			,	,	
		370	,				37.	,				500	•				
	+											- at				tat	1200
					_												1200
			s Pr	0 II	e Va			е ту	r Sei	Th			i GII	1 ALG	MI	Tyr	
	385					39	0				39	•				400	
																	1010
																ttc	1248
	Asp	Gl	n Va	l Le	u Hi	s As	p Va	l Al	a Il	e Gl	n Ly	s Le	u Pro	o Val	Le	u Phe	
					40	5				41	0				41	5	
																t cag	1296
	Ala	Il	e As	iA q	g Al	la Gl	y Il	e Va	1 G1	y Al	a As	p Gl	y Gl	n Th	r Hi	s Gln	•
				42			•		42					43			
															•		
	ggt	gc	t tt	it ga	at ct	c to	t ta	c ct	g cg	c tg	c at	a cc	g ga	a at	g gt	c att	1344
		_		_						_							

Glý	Ala	Phe 435	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu 440	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu 445	Meţ	Val	Ile	
		100					110				•	113		•		
atg	acc	ccg	agc	gat	gaa	aac	gaa	tgt	cgc	cag	atg	ctc	tat	acc	ggc	1392
Met		Pro	Ser	Asp	Glu	Asn	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Leu	Tyr	Thr	Gly	•
	450					455					460			٠.		•
tat	cac	tat	220	gat	aac	cca	tcá	aca	ata	cac	tar	cca	cat	-	220	1440
				Asp												1440
465	-	-		•	470					475					480	
•																
-	-			gaa	_			-	· .							1488
Ala	Val	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Leu		Lys	Leu	Pro	Ile		Lys	
		_		485				·	490		٠			495	•	•
aac	att	ata	aad	cgt	cat	aac	aaa	222	cta	aca	atc	ctt		+++	aat	1536
_			_	Arg	-				_							1550
			500	_		_		505					510			·
-																
	_			gaa				-	-		_	-		-	-	1584
Thr	Leu	•		Glu	Ala	Ala	-	Val	Ala	Glu	Ser		Asn	Ala	Thr	
		515					520					525				•
ctg	gtc	gat	atg	cgt	ttt	ata	aaa	cca	ctt	gat	даа	aca	tta	att	cta	1632
	_	-	-	Arg				_		-					-	
	530				•	535					540					
		_	_	agc		-			-		-	_	-		-	1680
545		ALA	Ala	Ser	550		Ala	Leu	vai	555	Val	GIU	GIU	ASI	560	
					330	٠.							•			
att	atg	ggc	ggc	gca:	ggc	agc	ggc	gtg	aac	gaa	gtg	ctg	atg	gcc	cat	1728
Ιlε	Met	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Met	Ala	His	
				565	•		•		570			•		575		
cat																1776
			-	. ccc	_					_	_	-				1776
	, _,.		580		, ,,,		7.00.	585	_	Deu		p	590			
										•	٠.				•	
cc	g caa	gga	act	cag	gaa	gaa	atg	cgc	gcc	gaa	ctc	ggc	ctc	gat	gcc	1824
Pro	Glr	_		Glr	Glu	Glu		_	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	
		595	•				600		•			605				
ac.	- ~~											.				1062
				a gco a Ala						_	-					1863
	610				. <i></i> , -	615	_			u	620					,

<210> 4

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser 1 5 10 15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
35 40 45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His 50 55 60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His 65 70 75 80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly 85 90 95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu 100 105 110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser 115 120 125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg 130 135 140

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala 145 150 155 160

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val 165 170 175

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu 180 185 190

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu 195 200 205

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
210 215 220

WO 00/08169 PCT/EP99/05467

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu .260 Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile 445. Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn

WO 00/08169 PCT/EP99/05467

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
485 490 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr 515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu 530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala 545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His 565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile 580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala 595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala 610 615 620

<210> 5

<211> 1469

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(1138)

<400> 5

gatateegag egeegeeggg tecaetgegg teegaageeg eggatgaete cattegaetg 60

aagccggtcg agccgcgct gcacggtgcc gcgcgcgacc ccgagccgcc gggacatctc 120

gageacteeg atgegeget eeeggeeag cageaceagg ageeggeegt ceagatgate 180

gategecacg geagececte cagtggteat cetgtae atg eag eee cae gee atg 235

Met Gln Pro His Ala Met

•

				aac Asn												283
			10					15					20			• .
				gag Glu												331
•		25					30					35			•.	
				cgc Arg												379
	40					45			•		50					
				ctt												427
55	λιg	GIY	Arg	Leu	60 60	Arg	Arg	GIII		65 65	ATa	GIÀ	Arg	ATA	70	
ctc	cac	cgc	ctt	cgg	cat	gca	gct	tgt	ggc	gta	ctc	cgg	acc	gga	gaa	475
				Arg					Gly					Gly		
			:	75					80					85		
				gac Asp												523
5			90	гор	7149			95	110	1113	GIN	ALY	100	GIY	1111	
				ctc												571
Leu.	Arg	Pro 105	His	Leu	Arg	His	Gln 110	Ala	Arg	His	Pro	Leu 115	Gly	Pro	Leu	
cct	cgc	cga	cca	tgt	ggc	cga	gca	cgg	cga	cgg	cgt	cgt	cga	cct	cgc	619
Pro	Arg 120	Arg	Pro	Cys	Gly	Arg 125	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg 130	Arg	Arg	Pro	Arg	
cat	cga	ggt.	CCC	gga	cgc	ccg	cgc	cgc	cca	cgc	gta	cqc	gat	cga	qca	667
His				Gly												
135		••		٠	140					145					150	
				ggt Gly									-	_		715
	9	110	Deu	155	Arg	Arg	Д	Var	160	Ύта	GIU	GIY	Arg	165	AEG .	
				cgc								-	-			763
His	Gly	Arg	Pro 170	Arg	Arg	Asp	Arg	His 175	Leu	Arg	Gln	Asp	Pro 180	Pro	His	
cct	cat	CŒ	cca	gac	caa	cta	сσа	caa	CCC	cta	cct	cer	caa	cta	cat	811
				Asp											_	VII
		185					. 190					195	•		-	

ggc cgc cgc ccc	gat cgt cga acc go	c cgc cca ccg cac ct	t cca ggc 859
Gly Arg Arg Pro	Asp Arg Arg Thr Al	a Arg Pro Pro His Le	u Pro Gly
200	205	210	
cat cga cca ctg	cgt cgg caa cgt cg	ga gct cgg ccg gat ga	a cga atg 907
His Arg Pro Leu	Arg Arg Gln Arg A	g Ala Arg Pro Asp Gl	u Arg Met
215	220	225	230
ggt cgg ctt cta	caa caa ggt cat gg	gg ctt cac gaa cat ga	a gga gtt 955
Gly Arg Leu Leu	Gln Gln Gly His G	y Leu His Glu His Gl	u Gly Val
	235	240	245
•			- -
cgt ggg cga cga	cat cgc gac cga g	ta ctc ggc gct gat gt	c gaa ggt 1003
Arg Gly Arg Arg	His Arg Asp Arg V	al Leu Gly Ala Asp Va	il Glu Gly
250	2	55 26	50
cgt ggc cga cgg	cac gct caa ggt c	aa gtt ccc gat caa co	a gcc cgc 1051
Arg Gly Arg Arg	His Ala Gln Gly G	ln Val Pro Asp Gln Ai	g Ala Arg
265	270	275	•
• :			
cct cgc caa gaa	gaa gtc cca gat c	ga cga gta cct gga gt	t cta cgg 1099
Pro Arg Gln Glu	Glu Val Pro Asp A	rg Arg Val Pro Gly Va	al Leu Arg
280	285	290	•
٠.			•
cgg cgc ggg cgt	cca gca cat cgc g	ct gaa cac ggg tga ca	atcgtcgag 1148
Arg Arg Gly Arg	Pro Ala His Arg A	la Glu His Gly	•
295	300	305	
		•	
acggtacgca cgat	gegege egeeggegte	cagttcctgg acacgcccg	a ctcgtactac 1208
	. ,	•	
gacaccctcg ggga	gtgggt gggcgacacc	cgcgtccccg tcgacaccc	t gcgcgagctg 1268
aagatcctcg cgga	ccgcga cgaggacggc	tatctgctcc agatcttca	c caageeggte 1328
caggaccgcc cgac	ggtctt cttcgagatc	atcgaacgcc acggctcga	t gggattcggc 1388
aagggcaact tcaa	ggccct gttcgaggcg	atcgagcggg agcaggaga	a gcggggcaac 1448
		:	3.450
ctgtaggcgg cgcg	idecedd d		1469

<210> 6
<211> 306
<212> PRT
<213> Streptomyces avermitilis

<400> 6 Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly

1	•			5		-			10			•		15		
Gln	Ala	Asn	Tyr 20	Cys	Ala	Pro	Cys	G1 y 25	Thr	Glu	Arg	Pro	Cys 30	Arg	His	
Asp	Ala	Asp 35	His	Thr	Pro	His	Ser 40	Arg	His	Arg	Pro	Ala 45	_	Arg	Pro	
Leu	Pro 50		Glu	Gly	Asn	Gly 55	Arg	Gly	Arg	Leu	Arg 60	Arg	Arg	Gln	Arg	•
Gln 65		Gly	Arg	Ala	Leu 70	Leu	His	Arg	Leu	Arg 75	His	Ala	Ala	Cys	61 y	
Val	Leu	Arg	Thr	Gly 85	Glu	Arg	Gln	Pro	Arg 90	Asp	Arg	Phe	Val	Arg 95	Pro	
His	Gln	Arg	Leu 100	Gly	Thr	Leu	Arg	Pro 105	His	Leu	Arg	His	Gln 110	Ala	Arg	
His	Pro	Leu 115		Pro	Leu	Pro	Arg 120		Pro	Cys	Gly	Arg 125	Ala	Arg	Arg	

Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro 135

Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg 145 150 155

Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu 165 170

Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro 180 185

Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg 200 205

Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala

Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu 235 230

His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu 245 250

Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val

265

270

Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg 275 280 285

Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu 290 295 300

His Gly

<210> 7

<211> 1479

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1):.(1401)

<400> 7

atg gcg acg gtt aca ctc aaa tcc ttc acc gga ctt cgt caa tca 48
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
1 5 10 15

tca acg gag caa aca aac ttc gtc tct cat gta ccg tca tca ctt tct 96 Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser 20 25 30

ctc cct caa cga cgg acc tct ctc cga gta acc gca gcc agg gcc act 144 Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr 35 40 45

ccc aaa ctc tcc aac cgt aaa ctc cgt gtc gcc gtc atc ggt ggt gga 192
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly
50 55 60

CCa gca ggc ggg gca gct gca gag act cta gca caa gga gga atc gag 240 Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu 65 70 75 80

acg att ctc atc gag cgt aag atg gac aat tgc aag cct tgc ggt ggc 288
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
85 90 95

gcg att cct ctc tgt atg gtc gga gaa ttc aac ttg ccg ttg gat att
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile

			•						•					-			
	att	gat	caa	aga	ata	acq	aag	atσ	ааσ	 atg	att	tea	cca	ten		att '	384
																Ile	304
			115	-			_,	120					125				• • .
													120	٠.			
	qct	att	gat	att	aat.	cat.	aca.	ctt	ааσ	gag	cat	~ ~ ~		2+2	aat	atg	433
										Glu							432
		130			01,	,y	135	DCu.	2,5	OIU.	HIS	140	ıyı	116	GIY	nec	,
٠.							100		:			140					
	ata	aga		ma a	a++	ctt	~=+	· ~~+	+=+	a+ =		-::-	:			aag	400
																Lys	480
	145	9	-u.y	GIU	V Q_1	150	wah	ALG	ıyı.	ъėя		GIU	Arg	Ala	GIU	_	• • • •
	145	•				130	*.				155					160	٠.
•	ant	~~~							:			•. • •					
										ttc							528
	Jer.	GLY	ALA	ini	165	TIE	Asn	GIÅ	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Asp		Pro	
					100				٠	170	•		٠.		175	•	
	a a d	224	+				.	·									
										cat							576
	GIU	ASII	rrp		Ser	PFO	туг	Thr		His	Tyr	Thr	GLu		Asp	Gly	
	-			180					185					190			
		act															
										aca							624
	273	1111	195	ATG	THE	стĀ	Thr	200°		Thr	тет	GIU		Asp	ATA	Val	
			. 193	•				200	•				205				
	att	gga	act	rat	aas	act		+ ~ +	200	gtt	act		+-+		~ ~+		672
																Ala	672
		210		ıwp	O+y		215		ALY	Val	Ala	220	SEL	116	Asp	VI.a	•
						•	210					220			-		
	aat	dat	tac	nac	tac	αca	att	acə	+++	cag	asa	- aa	2++		a++	cct	720
										Gln							120
	225				-,-	230					235	ALY		Arg		240	
							-				200					240	
	gat	gag	aaa	atσ	act	tac	tat	gag	gat	tta	act	nan.	ato	tat	att	aaa	768
										Leu							700
	•		4 -		245		- , -			250		014		-1-	255	Cly	
		•													200		
	gat	gat	ata	tca	cca	gat	ttc	·tat	aat	tgg	ata	ttc	cct	аап	tac	nac.	816
										Trp							010
	-	. •		260		·-₽	٠.	-1-	265		***		110	270	0,5	July	
	•					•							•	.270			
	cat	gta	act	att	gga	aca	aat	act	ata	act	cac	222	aat	nac.	ato	aag.	864
										Thr							004
			275		- - - y		Ų. y	280		-111	1112	nys	285	vah	116	nys.	•
		٠							•				203				
	aaa	tto	Can	cto	aca	200	202	220	200	gct	226	a	225	2++	a++		010
										Ala							912
	_,, 5			neu	nia	THE	wig	MSN	wed	WTG	ьys	ASP	ъÃ2	тте	ьeu	èтЛ	

1479

290 295 300 ggg aag atc atc cgt gtg gag gct cat ccg att cct gaa cat ccg aga 960 Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg 305 310 cca cgt agg ctc tcg aaa cgt gtg gct ctt gta ggt gat gct gca ggg Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly 325 330 tat gtg act aaa tgc tct ggt gaa ggg atc tac ttt gct gct aag agt Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser 340 345 gga aga atg tgt gct gaa gcc att gtc gaa ggt tca cag aat ggt aag Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys 355 360 aag atg att gac gaa ggg gac ttg agg aag tac ttg gag aaa tgg gat Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp 370 375 aag aca tac ttg cct acc tac agg gta ctt gat gtg ttg cag aaa gtg Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val ttt tac aga tca aat ccg gct aga gaa gcg ttt gtg gag atg tgt aat Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn 405 410 gat gag tat gtt cag aag atg aca ttc gat agc tat ctg tac aag cgg 1296 Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg 420 425 gtt gcg ccg ggt agt cct ttg gag gat atc aag ttg gct gtg aac acc Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr 435 440 att gga agt ttg gtt agg gct aat gct cta agg aga gag att gag aag Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys 450 455 ctt agt gtt taagaaacaa ataatgaggt ctatctcctt tcttcatctc 1441 Leu Ser Val

tatctctctt tttttgtctg ttagtaatct atctacac

465

<210>	8
<211>	467

<212> PRT <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser

1 5 10 15

Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser 20 25 30

Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr 35 40 45

Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly 50 55 60

Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
65 70 75 80

Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
85 90 95

Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile 100 105 110

Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile 115 120 125

Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met 130 135 140

Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys 145 150 155 160

Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro 165 170 175

Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
180 185 190

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val 195 200 205

Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala 210 215 220

Gly	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Ile	Ala	Phe	Gln	Glu	Arg	Ile	Arg.	Ile	Pro
225					230					235	,				240

- Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
 245 250 255
- Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp 260 265 270
- His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys 275 280 285
- Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly 290 295 300
- Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg 305 310 315 320
- Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly 325 330 335
- Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser 340 345 350
- Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys 355 360 365
- Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp 370 375 380
- Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
 385 390 395 400
- Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn 405 410 415
- Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg 420 425 430
- Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr 435 440 445
- Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys 450 455 460

Leu Ser Val 465

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 99/05467

ÎPC 7	C12N15/53 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N9 C12Q1/02 A01H5/00	9/04
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
	BEARCHED	
Mnimum do IPC 7	cumentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A01H	
	on searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields se- tion base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	NTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANGE B M ET AL: "A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA.	1,2,9, 13,17,18
Y	(1998 MAR 3) 95 (5) 2100-4., XP002116672 cited in the application see particularly the las paragraph	20,21
X	MANDEL A. ET AL.: "CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution" PLANT JOURNAL,	22
	vol. 9, no. 5, 1996, pages 649-658, XP002122907 the whole document	
X Furt	er documents are Seted in the continuation of box C.	ermex.
"A" docume consider of filing de "L" docume which i challer of docume other n	nt which may throw doubte on priority claim(s) or so thed to certainties or the document of particular relevance; the claim or or other special reason (as specified) committee of committee or more document to combined with one or more document is combined with one or more	e application but ny underlying the imed invention e considered to ment is taken alone imed invention ntive step when the ocher such docu- to a person skilled
Date of the	ctual completion of the international search Date of mailing of the international search	h report
17	November 1999 03/12/1999	· · · · · ·
Name and m	Eling address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaen 2 NL - 2280 HV Rijmeljt Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 Kania, T	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A .cational Application No PCT/EP 99/05467

	ction) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	Relevant to claim No.
ategory *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	
,	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24 July 1996 (1996-07-24) page 3, line 35-54	20,21
· .	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 (1997-07-31)	1-22
	cited in the application the whole document	
\	WO 98 06862 A (SHEWMAKER CHRISTINE K; CALGENE INC (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) the whole document	1-22
.	LOIS L M ET AL: "Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a	1-22
	transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol	
	blosynthesis." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998 MAR 3) 95 (5) 2105-10., XP002116673 the whole document	
A	SPRENGER G A ET AL: "Identification of a thiamin-dependent synthase in Escherichia coli required for the formation of the 1-deoxy-D- xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA,	1-22
•	(1997 NOV 25) 94 (24) 12857-62., XP002116674 cited in the application the whole document	
A	KELLER ET AL: "metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis — evidence for the involvement of a	1-22
	multifunctional geranylgeranyl reductase* EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, DE, BERLIN, vol. 251, no. 1/02, page 413-417-417 XP002100518 TSSN: 0014-2056	
	ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document	120
P,X	WO 99 11757 A (MCCASKILL DAVID G ;LANGE BERND M (US); UNIV WASHINGTON (US); WILDU) 11 March 1999 (1999-03-11) see particularly Page 14 line 29 to Page 15 line 21.	1,2,9, 13,17-22

Som PCT/88A/210 (confination of second sheet) LNAV 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 99/05467

8	tion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with Indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. 20,21 18–22	
P,X	DE 197 52 700 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 2 June 1999 (1999-06-02) see particularly Page 6 line 20 and following;		
E	Example 6 W0 99 52938 A (HASSAN JOMAA) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document		
		<i>y</i> . *	

INTER IATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

h ational Application No PCT/EP 99/05467

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723017	A	24-07-1996	DE 19501906 A CA 2167768 A US 5912169 A US 5925535 A	25-07-1996 24-07-1996 15-06-1999 20-07-1999
WO 9727285	· A	31-07-1997	AU 1845397 A EP 0877793 A JP 11510708 T	20-08-1997 18-11-1998 21-09-1999
WO 9806862	A	19-02-1998	AU 4058497 A CN 1227609 A EP 0925366 A	06-03-199 8 01-09-199 9 30-06-19 99
WO 9911757	A	11-03-1999	AU 8925898 A	22-03-1999
DE 19752700	A	02-06-1999	DE 29800547 U JP 11169186 A	08-04-19 99 29-06-19 9 9
WO 9952 938	A	21-10-1999	DE 19825585 A WO 9952515 A	21-10-1999 21-10-1999